

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Marija Mihaljević

Patofiziološko značenje autoantitijela u krvi bolesnika sa solidnim tumorima

Diplomski rad



Zagreb, 2015.

Diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Sirotković – Skerlev i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014 / 2015.

Kratice

AMACR-(engl. α -methylacyl CoA racemase) α -metilacil CoA racemaza

CEA-(engl. carcinoembryonic antigen) karcinoembrionalni antigen

cdk 2- (engl. cell division stimulating protein) protein koji potiče staničnu diobu

CT-(engl. cancer-testis) antigeni- antigeni koje kodiraju geni izraženi u zametnim stanicama

EGRF-(engl. epidermal growth factor receptor) epidermalni čimbenik rasta

ELISA- (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) imunoenzimski test

FAP-(engl. familial adenomatous polyposis) obiteljska adenomatozna polipoza

FDA –(engl. food and drug administration) američka agencija za hranu i lijekove

FOBT-(engl. fecal occult blood test) test na okultno krvarenje u stolici

GIPC-1 – protein uključen u regulaciju signala putem G-proteina

GRP78-(engl. glucose regulated proteins) proteini koji su regulirani glukozom

HIP1-(engl. huntingtin-interactin protein) protein koji reagira s huntingtinom

HNPCC-(engl. nonpolyposis colorectal cancer) nepolipozni kolorektalni karcinom

HSP-70- (engl. heat shock protein) stanična stresna bjelančevina-70

IAP-(engl. inhibitor of apoptosis proteins) inhibitori apoptoze

IGFBP- (engl. insulin-like growth factor binding-proteins) proteini koji vežu inzulinu sličan čimbenik rasta

MUC1-(engl. mucine 1) mucin 1

PEM-(engl. polymorphical epithelial mucine) polimorfijski epitelijski mucin

PSA-(engl. prostate specific antigen) prostata specifični antigen

PTM- (engl. post translational modifications) posttranslacijske modifikacije

RPH3AL-(engl. rabhlin 3A like protein) protein sličan rabhlinu 3A

TAA- (engl. tumor associated antigen) tumorski antigen

XIAP-(engl. x-linked IAP) x vezani IAP

SADRŽAJ

1. SAŽETAK:	1
2. SUMMARY	2
3.ŠTO SU BIOMARKERI.....	3
4. AUTOANTITIJELA	4
5. IMUNOLOGIJA TUMORA.....	4
6.KARCINOM DOJKE.....	5
6.1 BIOMARKERI KARCINOMA DOJKE I AUTOANTITIJELA.....	6
6.2 AUTOANTITIJELA NA P53	6
6.3 AUTOANTITIJELA NA MUC1 PROTEIN.....	7
6.4 AUTOANTITIJELA NA HER2/Neu/ cErbB2(p185) PROTEIN.....	9
6.5 AUTOANTITIJELA NA STANIČNE STRESNE BJELANČEVINE	10
6.6 AUTOANTITIJELA NA GIPC-1 PROTEIN	11
6.7 AUTOANTITIJELA NA c-myc i c-myb PROTEIN.....	12
6.8 AUTOANTITIJELA NA NY-ESO-1 PROTEIN.....	12
6.9 AUTOANTITIJELA NA BRCA PROTEINE.....	13
6.10 AUTOANTITIJELA NA ENDOSTATIN	13
6.11 AUTOANTITIJELA NA LIPOFILIN B	14
6.12 AUTOANTITIJELA NA CIKLINSKE PROTEINE.....	14
6.13 AUTOANTITIJELA NA FIBULINSKI PROTEIN.....	15
6.14 AUTOANTITIJELA NA PROTEINE KOJI VEŽU INZULINU SLIČNE FAKTORE RASTA (INSULIN- LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 2, IGFBP-2).....	15
6.15 AUTOANTITIJELA NA TOPO2 α PROTEIN	16
6.16 AUTOANTITIJELA NA KATEPSIN D	16
7. KARCINOM PROSTATE	17
7.1 UVOD.....	17
7.2 PSA AUTOANTITIJELA.....	18
7.3 AUTOANTITIJELA NA HER2/NEU.....	18
7.4 AUTOANTITIJELA NA HUNTINGTIN-INTERACTING PROTEIN 1 (HIP1).....	19
7.5 AUTONATITIJELA NA GLUKOZOM REGULIRANI PROTEIN-78 (GRP78).....	19
7.6 AUTOANTITIJELA NA ALPHA-METHYLACYL CoA RACEMASE (AMACR).....	20
7.7 AUTOANTIJELA NA PROTEIN KINAZU A (ECPKA)	21
7.8 AUTOANTITIJELA NA PROSTASOME	21
7.9 AUTOANTITIJELA NA MULTIPLE BIOMARKERE	22

7.10 AUTOANTITIJELA NA EPITELNI FAKTOR RASTA P75 (LEDGF P75)	22
8. KARCINOM KOLONA	22
8.1 UVOD.....	22
8.2 AUTOANTITIJELA NA MUC5AC	24
8.3 AUTOANTITIJELA PROTIV IAPA I XIAPA.....	24
8.4 AUTOANTITIJELA NA Ca^{2+} VEŽUĆI PROTEIN „CALNUC“	25
8.5 AUTOANTITIJELA NA RABHILIN 3A LIKE PROTEIN (RPH3AL)	25
8.6 AUTONTITIJELA NA RAS PROTEINE	25
8.7 AUTOANTITIJELA NA p21.....	26
8.8 AUTOANTITIJELA USMJERENA NA VILIN.....	26
9. ZAKLJUČAK	28
10 . ZAHVALE	29
11.LITERATURA.....	30
12. ŽIVOTOPIS.....	34

1. SAŽETAK:

PATOFIZIOLOŠKO ZNAČENJE AUTOANTITIJELA U KRVI BOLESNIKA SA SOLIDNIM TUMORIMA, Marija Mihaljević

Biomarker je bilo koja molekula koja uzrokuje promjenu fiziološkog stanja pojedinca na bolest, terapiju ili toksine. U tom pogledu, autoantitijela povezana s karcinomima su odlični kandidati za detektiranje karcinomskih biomarkera koji se pojavljuju kao reakcija imunološkog sustava na tumor. Stvaranje autoantitijela koja se pojavljuju prema autolognim karcinomskim antigenima nije statično i mjerljivo je različitim analizama. Autoantitijela su izrazito stabilna u humanom serumu i dugo perzistiraju nakon uklanjanja antigena. To je njihova izrazita prednost te se koriste kao potencijalni markeri u tjelesnim tekućinama za detekciju karcinomskih antigena. Za razliku od autoantitijela, karcinomski antigeni imaju kratko poluvrijeme raspada. Zbog toga, stabilnost autoantitijela je bitna u razvoju laboratorijskih testova. Glavna uloga pronalaska autoantitijela je u tome da se razlikuje fiziološko stanje od patološkog, prvenstveno u ranim asimptomatskim fazama karcinoma. Probir biomarkera mogao bi poboljšati dijagnostičku vrijednost medicinskog statusa, testova i ostalih procedura. Ostali testovi probira kao što su mamografija i kolonoskopija pomažu u pronalasku inicijalnih znakova karcinoma. Istraživanje autoantitijela je bitno da bi se utvrdila bolest u inicijalnoj fazi. U otkrivanju biomarkera su razvijene razne strategije. Osjetljivost i specifičnost testova mora biti dovoljno visoka da bi se autoantitijela upotrijebila za skrining. Potrebno je daljnje istraživanje autoantitijela i tehnika koja bi ih otkrivala. To bi moglo doprinijeti ranoj dijagnostici karcinoma i većem uspjehu terapije.

Ključne riječi: autoantitijela, probir karcinoma, biomarkeri

2. SUMMARY

PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF CIRCULATING AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH SOLID TUMORS, Marija Mihaljević

A biomarker is any molecule that indicates an alteration of the physiological state of an individual relevant to disease state, treatment and toxins. In this field, autoantibodies are being considered as excellent candidates for cancer markers as they represent response of the immune system. The generation of these autoantibodies in response to autologous cellular antigens is not static and it is measurable by analyses. Autoantibodies are extremely stable in serum samples and are known to persist for extended times after removal of the antigenic factor. This is a distinct advantage for their use and are potential markers for detection of carcinoma in human fluids. Cancer antigens have limited half-life. Indeed, the stability of autoantibodies is important for development of laboratory tests. The main objective of autoantibodies discovery is to identify molecular markers capable of discriminating the „healthy“ state from the „disease“ state preferentially in the early asymptomatic stages. Biomarker screening test may enhance the diagnostic value of physical examination, medical tests or other procedures. Cancer screening procedures such as mammography or screening colonoscopy serve in finding initial signs of cancer. Different strategies have been developed in discovering biomarkers. The sensitivity and the sensibility of screening test must be high for the detection of the autoantibodies. Developing strategies for autoantibodies are needed. That may contribute to early cancer detection and improvement of therapy results.

Key words: autoantibodies, cancer screening, biomarkers

3.ŠTO SU BIOMARKERI

Biomarkeri su pokazatelji biološkog stanja koji se mogu mjeriti te njihova povišena vrijednost može biti indikator normalnog biološkog procesa, patološkog procesa ili farmakološke reakcije na terapiju. Svaki biološki sustav ima svoj specifični biomarker. Mnogi biomarkeri su relativno jednostavni za uporabu.

Karakteristike idealnog biomarkera su:

1. Sigurnost i jednostavnost izvođenja
2. Povoljna cijena
3. Promjenjiva vrijednost tokom terapije
4. Dosljednost spolu i etničkim grupama

Biomarkeri se koriste za dijagnosticiranje bolesti kao što su tumori, endokrinološke bolesti, kardiovaskularne bolesti itd (Ananya Mandal,MD).

Tumorski biomarkeri su molekule koje proizvodi sam tumor ili reakcija imunološkog sustava. Tumorski biomarkeri mogu biti rezultat mutacije ili promjene u genskoj ekspresiji ili metilaciji promotora. Sami po sebi, biomarkeri mogu biti promijenjeni proteini ili autoantitijela. Tumorski biomarkeri se koriste u slijedećem:

1. Ranoj detekciji
2. Dijagnozi
3. Prognozi bolesti
4. Praćenju reakcije na terapiju
5. Praćenju preživljenja

4. AUTOANTITIJELA

Autoantitijela u serumu bolesnika s tumorom su rezultat imunološke reakcije organizma na prevelik izražaj ili mutirane proteine (Tainsky, 2009). Brojne su teorije nastanka autoantitijela. Jedna od njih je imunološka reakcija organizma na antigene povezane s tumorom (TAA, prema engl. tumor associated antigens). To se događa u ranoj karcinogenezi i u njoj se prepoznaju i uništavaju stanice koje su tumorske. Proizvodnja autoantitijela može biti dio odgovora na izmijenjene antigene (uslijed metilacije, degradacije ili pretjerane ekspresije proteina u oštećenom tkivu). Također, postoji mišljenje da proizvodnja autoantitijela može biti odgovor na loše prezentirane i pogrešno ustrojene proteine. Proteini koji su izmijenjeni posttranslacijskim modifikacijama (PM) mogu biti prepoznati kao „neautologni“ proteini tj. fosforilacija, glikozilacija i oksidacija tumorskih antigena može stvoriti neo-epitope (Zaenker i sur. 2013).

5. IMUNOLOGIJA TUMORA

Imunološki sustav se dijeli na humoralni i stanični. Humoralnu imunost uključuju antitijela dok stanična uključuje stanice. Stanice kao što su makrofazi i prirodno ubilačke stanice imaju sposobnost detektiranja i uništenja antigena. T limfociti se dijele na citotoksične, pomagačke i regulatorne. Oni imaju receptore za prepoznavanje antigena. Pomagački T limfociti potiču B limfocite na proizvodnju antitijela, a citotoksični T limfociti služe za eliminaciju patogena. Regulacijski T limfociti nadziru T pomagačke i T citotoksične limfocite. Princip djelovanja antitijela je neutralizacija antigena, predočavanje makrofazima, djelovanje putem sustava komplementa. Funkcija imunološkog sustava je prepoznavanje i eliminiranje antigena. Prepoznavanje antigena može biti otežano ili onemogućeno budući da je puno tumorskih antigena (TAA) dio normalnih stanica te u nekim slučajevima nastaje

tolerancija. Neki TAA nikad ne izazivaju imunološki odgovor jer su prisutni samo u embrijima ili u imunološki privilegiranim mjestima kao što su mozak i testisi, gdje se razvoj tolerancije na stanične antigene ne događa. Imunološki sustav konstantno „skenira“ tkiva da bi pronašao tumorske antigene i otklonio ih. Neki tumori mogu napredovati u organizmu jer su tumorski antigeni slabi i ne izazivaju odgovor. Neki su antigeni na početku bili jaki, ali su modificiranjem postali slabi. To je sve dio imunoinvazivne strategije samih tumora. Promijenjena tkiva u kojima su tumorske stanice, izražavaju TAA. Suprimirajući TAA, tumorske stanice mogu izbjeći odgovor imunološkog sustava i proliferirati. Druga imunoinvazivna strategija tumorskih stanica je oslobađanje faktora kao što su IL-10, FasL te TGF- β da bi se izbjegao imunološki odgovor. Budući da imunološki sustav često izbjegne imunološku reakciju, znanstvenici su razvili brojne terapije i suplemente kako bi pojačali imunološki sustav. Razvitak imunoterapije tumora bi mogao doprinijeti eliminaciji tumora. Razvoj imunološkog odgovora na tumorske antigene još je uvijek nedovoljno objašnjen.

6.KARCINOM DOJKE

Karcinom dojke je najčešći karcinom u žena i drugi uzrok smrti kod žena. Potrebni su novi pristupi u skriningu, ranoj dijagnostici, prognozi i analizi rizika dobivanja bolesti da bi se smanjio mortalitet i povećalo preživljenje od karcinoma. Za sada je mamografija zlatni standard probira i ona je glavni test probira za smanjenje smrtnosti od karcinoma dojke. Osjetljivost mamografije pada s gustoćom tkiva dojki. Tako je zabilježena osjetljivost od 45% u osoba s jako gustim tkivom dojki. Također, mamografija može dovesti do pogrešnih rezultata (npr. dijagnostika promjena dojki koje ne treba dalje obrađivati) te dovodi do nepotrebne obrade pacijenata. Uloženi su brojni naponi da se uvede metoda probira koja će detektirati rane stadije karcinoma.

Detektiranje karcinoma magnetskom rezonancom (MR) je mnogo bolja metoda nego ultrazvuk i mamografija no ima nisku specifičnost (Lacombe i sur. 2014).

6.1 BIOMARKERI KARCINOMA DOJKE I AUTOANTITIJELA

Za ranu detekciju karcinoma, testovi probira bi trebali zadovoljavati slijedeće:

1. Moraju razlikovati zdrave osobe od osoba koje su bolesne.
2. Moraju imati visok stupanj osjetljivosti i specifičnosti.
3. Mora biti omogućeno razlikovanje benignih i malignih bolesti
4. Moraju biti financijski povoljni (Lacombe i sur. 2014).

6.2 AUTOANTITIJELA NA P53

P 53 je tumor supresorski gen. Nalazi se na 17. kromosomu. Mutirani p 53 se nalazi u karcinomskim stanicama. Promjene stanica, uključujući oštećenje DNA, aktiviraju p53 koji je „čuvar genoma“ te on blokira diobu stanice s oštećenom DNA . Popravlja DNA prije nego što nastupi ciklus novog dijeljenja stanice. Kada su oštećenja stanice velika („nepopravljiva“) p53 potiče proces apoptoze. Na taj način sprječava rast abnormalnih stanica (Kulić i sur. 2009). Mutirani p53 potiče proizvodnju p21, koji onda reagira s cdk 2 (prema engl. cell division stimulating protein). P21 je inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima (CDK, prema engl. cycline dependent kinases) (Gamulin i sur. 2011). P53 potiče proizvodnju trombospodina 1, proteina koji je inhibitor angiogeneze. Inaktivacija p53 pridonosi nestabilnosti staničnog genoma i povećava vjerojatnost maligne alteracije (Piura i Piura, 2010).

Dok je u istraživanju Angelopoulou i sur. 9% pacijenata s karcinomom dojke imalo p53 autoantitijela, istraživanje koje su objavili A.Kulić i sur. 2009. godine, utvrdilo je postojanje anti-p53 antitijela u 35% bolesnika s karcinomom dojke te 5% u kontrolnoj

skupini (Angelopoulou i sur. 2000; Kulić i sur. 2009). Godine pacijenata i razine p53 autoantitijela su obrnuto proporcionalne. Razina p53 autoantitijela je povezana s veličinom tumora, histološkom razvijenošću tumora i zahvaćenošću limfnih čvorova. Razina autoantitijela je niža kod osoba koje imaju negativne receptore za estrogen i progesteron, za razliku od onih koji su receptori bili pozitivni na hormone te imaju veću razinu autoantitijela. Nije utvrđena povezanost autoantitijela sa razinom Katepsina D u citosolu niti s HER2 /neu izvanstaničnim domenama. Pacijenti s visokim razinama anti-p53 imaju niže petogodišnje preživljenje nego pacijenti s nižim razinama anti-p53 protutijela (Kulić i sur. 2009). Anti- p53 protutijela su također zabilježena kod osoba koje nemaju ekspresiju p53 a imaju tumor. Objašnjenje leži u tome da nekrotični tumori i metastaze sadrže veliku količinu „divljeg“ p53. Autoantitijela su usmjerena na epitope koji su smješteni na ugljikovom kraju p53 molekule. Karcinom dojke je karcinom s najboljim imunološkim odgovorom na p53 od svih tumora. Iako 35% pacijenata s tumorom dojke proizvodi anti-p53 autoantitijela, nije jasno zašto mutirani p53 (koji je prisutan u 50% pacijenata s karcinomom dojke) potiče proizvodnju autoantitijela. Pretpostavlja se da samo p53 smješten na petom i šestom egzonu, veže za HSP-70 i potiče proizvodnju anti-p53 autoantitijela (Piura i Piura, 2010).

6.3 AUTOANTITIJELA NA MUC1 PROTEIN.

Polimorfični epitelijski mucin (PEM, MUC1) je ljudski mucinski protein koji ima veliku molekularnu masu. On je hiperglikoziliran te je u malim dozama prisutan u normalnim epitelnim stanicama. Hipoglikoziliran i u velikim dozama je prisutan u većini adenokarcinoma kao što je karcinom dojke te karcinom ovarija. Jedna trećina bolesnika s karcinomom dojke ima autoantitijela na MUC1. Ta autoantitijela su u slobodnoj formi ili su pridružena imunom kompleksu. Autoantitijela koja su pridružena

imunokompleksu imaju značajnu ulogu u prognozi karcinoma, dok je prisutnost autoantitijela u slobodnoj formi manje jasna. Osobe koje imaju autoantitijela na MUC1 imaju povoljniju prognozu te se smatra da postojanje MUC specifične imunosti smanjuje rizik za dobivanje tumora dojke. Kotera i sur. su 1994 utvrdili da je 8.3% osoba s karcinomom dojke, 16.7% osoba s karcinomom gušterače te 10% pacijenata s karcinomom kolona imalo autoantitijela na MUC1. Prisutnost ili odsutnost autoantitijela nije korelirala s razinom cirkulirajućeg mucina niti stadijem bolesti (Piura i Piura, 2010).

Von Mensdorff- Pouilly i sur. su 1996. godine utvrdili uz pomoću ELISA testa (prema engl. enzyme-linked immunoassay) postojanje autoantitijela na MUC1 u 2.1% zdravih kontrola, 37.5% osoba s benignim tumorom dojke, 25.7% osoba s ranim stadijem karcinoma dojke i 18% osoba s uznapredovalim stadijem karcinoma dojke. 20.3% bolesnika koji su imali pozitivne limfne čvorove i 32.4% koji su imali negativne čvorove su imali autoantitijela. Količina autoantitijela i stadij bolesti su bili obrnuto proporcionalni. Dok je 50% osoba koje su imale karcinom in situ imalo autoantitijela na MUC1, samo je 6,7% pacijenata s 5 zahvaćenih limfnih čvorova imalo povišenu razinu anti-MUC1 autoantitijela. Pacijenti s udaljenim metastazama su bili seronegativni na MUC1. Petogodišnje preživljenje 13 osoba koje su imale povišenu razinu CA-15-3 i bili anti-MUC1 seropozitivni je bilo bolje, nego petogodišnje preživljenje 41 osobe koji su imali povišenu razinu CA-15-3 ali su bili anti-MUC1 seronegativni. Autori su potvrdili da povezanost humoralne imunosti i MUC1 štiti od progresije bolesti. Tolerancija ili nedovoljan imunološki odgovor pridonosi nepovoljnom ishodu bolesti (Piura i Piura, 2010).

Champan i sur. su utvrdili postojanje autoantitijela na MUC1 u 20.2% osoba s rano dijagnosticiranim karcinomom dojke i 25% osoba s duktalnim karcinomom in situ. Osjetljivost i specifičnost za karcinom dojke u tom istraživanju su iznosile: 23% i 98%.

Lu i sur. su ispitivali porast autoantitijela na p53, HER2, MUC1, topoizomerazu II alfa, IGFBP2 (od engl. insulin-like growth factor binding protein 2), Ciklin D1 i na Katepsin D u pacijenata s karcinomom dojke. Odgovor autoantitijela na MUC1 je bio 20% u karcinomu dojke, a 3% u zdravih osoba.

Autoantitijela na MUC1 imaju malu vrijednost u probiru, no predstavljaju dijagnostički potencijal u istraživanju autoantitijela na TAA te njihovo detektiranje može biti povezano s manjim rizikom razvoja karcinoma dojke. Postojanje autoantitijela na MUC1 je povezano s povoljnim ishodom bolesti (Piura i Piura, 2010).

6.4 AUTOANTITIJELA NA HER2/Neu/ cErbB2(p185) PROTEIN

HER2/neu je dio obitelji receptora za epidermalni čimbenik rasta EGFR (od engl. epidermal growth factor). HER2/neu receptor je izražen u 20-30% karcinoma dojke. Osobe koje su HER2/neu pozitivne imaju lošiju prognozu i veliku incidenciju metastaza te rezistenciju na hormonalnu i konvencionalnu kemoterapiju. Uvođenje u terapiju anti –HER2/neu lijekova znatno je poboljšalo prognozu ovih bolesnica. U istraživanju Chapmana i sur. anti-HER2/neu autoantitijela su detektirana u 17% osoba s novootkrivenim karcinomom dojke i u 12.5% osoba s duktalnim karcinomom in situ. Osjetljivost i specifičnost testova su bile 18% i 94% za karcinom dojke te 13% i 94% za duktalni karcinom in situ. Zaključeno je da autoantitijela na HER2/neu imaju malu vrijednost u probiru i ranoj dijagnozi karcinoma dojke, no moguće je da imaju ulogu u obrani domaćina (Piura i Piura, 2010).

Disis i sur. su 1994. godine, uz pomoć Western blot analize potvrdili postojanje autoantitijela na HER2 u 55% pacijenata s karcinomom dojke. Ovi autori smatraju da HER2/neu onkoprotein može potaknuti reakciju imunološkog sustava i poslužiti za imunoterapiju tumora. 1997 su upotrijebili ELISA test , a rezultati su bili drugačiji. Naime, u ELISA testu su utvrđena autoantitijela na HER2/neu u 20.4% pacijenata s karcinomom dojke. Isti autori su 2000. godine ispitivali antitijela na HER2 u bolesnica s uznapredovalom bolešću i utvrdili pozitivan rezultat u 6,6% bolesnica. (Piura i Piura, 2010) Manja incidencija autoantitijela na HER2/neu u uznapredovalim stadijima karcinoma dojke u usporedbi s koncentracijama u ranim stadijima bolesti, ukazuje da bi autoantitijela na HER2/neu mogla imati ulogu u smanjenju progresije karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

6.5 AUTOANTITIJELA NA STANIČNE STRESNE BJELANČEVINE

Stanične stresne bjelančevine (HSP, od engl. heat shock proteins) su citoplazmatski proteini koji se ponašaju kao pratitelji-zaštitnici molekularnih proteina u unutarstaničnim procesima (Gamulin i sur. 2011). HSP imaju veliku ulogu u međusobnoj interakciji proteina uključujući slaganje i ustroj proteina. Prvi puta su otkriveni pri visokoj temperaturi, od tuda i dolazi podrijetlo imena. Osim povišene temperature, njihova je proizvodnja vezana i za upalu, infekciju, ishemiju, citotoksične lijekove i maligna stanja. HSP su raspoređeni u obitelji prema molekularnoj masi.

Jaka ekspresija HSP-27 je povezana s kraćim preživljenjem u karcinomu dojke. Conroy i sur. su 1998 . godine utvrdili postojanje autoantitijela na HSP-27 u 37.8% pacijenata sa karcinomom dojke. Mortalitet je bio niži kod onih pacijentica koje su imale autoantitijela, nego kod onih koje nisu imale autoantitijela.

HSP-60 je protein koji se nalazi u mitohondrijskom matriksu. On kontrolira brojne stanične funkcije i pomaže u izgradnji, rastavljanju i degradaciji mitohondrijskih proteina. Također je uključen u proces apoptoze i reagira s proteinima koji su dio staničnog ciklusa. Desmetz i sur. su utvrdili autoantitijela na HSP-60 u 32.6% pacijenata s duktalnim karcinomom in situ i 31% u ranom stadiju bolesti te 4.3% u zdravih ispitanika. Frekvencija autoantitijela je bila viša u osoba s visokim stupnjem DCIS (duktalni karcinom in situ) 47.8%, nego niskim stupnjem DCIS (19.2%). Autoantitijela na HSP-60 odlikuju se specifičnošću 95.7% i osjetljivošću 31.8%. Nije pronađena povezanost između autoantitijela na HSP-60 i estrogenskih, progesteronskih receptora te HER-2 statusa. HSP-60 autoantitijela imaju veliki potencijal u ranoj dijagnostici karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

6.6 AUTOANTITIJELA NA GIPC-1 PROTEIN

GIPC protein je dio PDZ obitelji i uključen je u regulaciju G proteina te je prisutan u karcinomu dojke i jajnika. Yalevski i sur. su upotrebljavajući monoklonska protutijela 27.B1 i 27.F7, dokazali autoantitijela na GIPC-1 u 96% i 48% osoba s duktalnim karcinomom dojke te 90% i 53% lobularnog karcinoma dojke. GIPC-1, koji je bio detektiran putem 27.B1 i 27.F7 protutijela, je bio prisutan samo u invazivnim karcinomima dojke. Autori su potvrdili povezanost GIPC-1 s tumorom te smatraju da autoantitijela na GIPC-1 imaju veliki potencijal kao marker karcinoma dojke. Salma i sur. su testirali 22 seruma osoba s karcinomom dojke, 11 s epitelnim karcinomom jajnika te serum zdravih kontrola. Kemoluminiscentna metoda je potvrdila 77% i 54% autoantitijela na GIPC-1 u karcinomu dojke i jajnika. ELISA je pak potvrdila postojanje 27% i 18% autoantitijela na GIPC-1 u karcinomu dojke i jajnika (Piura i Piura, 2010).

6.7 AUTOANTITIJELA NA c-myc i c-myb PROTEIN

Myc gen kodira c-myc protein koji je bitan za rast stanica i proliferaciju te je uključen u tumorigenezu. Serumska anti-c-myc antitijela su detektirana u 12.7% pacijenata s novootkrivenim karcinomom dojke i 7.5 % pacijenata s karcinomom in situ. Osjetljivost i specifičnost su bile 13% i 97% za karcinom dojke i 8% i 97% za duktalni karcinom in situ. Zaključeno je da koncentracija autoantitijela na c-myc ima malu vrijednost u ranoj dijagnostici karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

Myb gen kodira c-myb protein, koji je potreban u razvoju T limfocita u raznim stadijima staničnog ciklusa. Sorokine i sur. su utvrdili IgG autoantitijela na c-myb u 43% osoba s karcinomom dojke, uspoređujući ih s prisutnosti u 24.5% zdravih kontrola. Nije pokazana povezanost cirkulirajućih autoantitijela na c-myb i ekspresije c-myb u karcinomima dojke (Piura i Piura, 2010).

6.8 AUTOANTITIJELA NA NY-ESO-1 PROTEIN

Geni koji su smješteni u humanim zametnim stanicama kodiraju Cancer-testis (CT) antigene. Somatska tkiva odraslih osoba reguliraju CT antigene, ali CT antigeni postaju jako izraženi u nekim tipovima karcinoma. CT antigeni pridruženi kromosomu X su nazvani CT-X antigeni i razlikuju se od non-X CT antigena koji su smješteni na autosomima. CT-X antigeni predstavljaju polovicu CT antigena i njihova ekspresija je povezana sa slabijim ishodom i višim stupnjem razvijenosti tumora. Nekoliko studija istražilo prisutnost CT antigena u karcinomu dojke. Zanimljivo je da su izražaji CT antigena, NY-ESO-1 i MAGE-A povišeni u tumorima dojke koji su hormonski negativni. Autoantitijela na NY-ESO-1 su prisutna u 26.6% pacijenata sa novodijagnosticiranim karcinomom dojke i kod 7.5% pacijenata s duktalnim karcinomom in situ. Osjetljivost i specifičnost analize su bile 26% i 94% za karcinom dojke te 8% i 94% za duktalni karcinom in situ. Titar autoantitijela na NY-ESO-1 ima

malu vrijednost za skrining tumora dojke te su potrebna daljnja istraživanja (Piura i Piura, 2010).

6.9 AUTOANTITIJELA NA BRCA PROTEINE

BRCA 1 i BRCA 2 su tumor supresorski geni. BRCA 1 je smješten na 17. kromosomu a BRCA2 na 13. kromosomu. 185delAG i 538insC mutacije u BRCA 1 i 617delT mutacije u BRCA 2 su prisutne kod Aškenazi Židova. Aškenazi Židovi koji imaju mutacije na BRCA 1 i BRCA2, imaju veći rizik dobivanja karcinoma dojke i ovarija. Autoantitijela na BRCA1 i BRCA2 su prisutna u 8.5% i 34% invazivnih karcinoma in situ te 2.5% i 22.5% osoba s duktalnim karcinomom in situ. Osjetljivost i specifičnost anti-BRCA1 je 8% i 91% za invazivni karcinom in situ te 3% i 91% za duktalni karcinom in situ. Osjetljivost i specifičnost za autoantitijela za BRCA2 je 34% i 92% za invazivni karcinom dojke te 23% i 92% za duktalni karcinom in situ.

Zaključeno je slijedeće:

1. Autoantitijela na BRCA1 nemaju vrijednosti u skriningu i ranoj detekciji karcinoma dojke
2. Autoantitijela na BRCA1 nemaju dijagnostički potencijal
3. Autoantitijela na BRCA2 imaju malu vrijednost u skriningu i ranoj dijagnostici karcinoma dojke
4. Autoantitijela na BRCA2 imaju potencijal u dijagnostici karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

6.10 AUTOANTITIJELA NA ENDOSTATIN

Endostatin je jedan od najpoznatijih prirodnih inhibitora angiogeneze koji se nalazi na ugljikovom fragmentu kolagena 18. Kolagen 18 je prisutan u perivaskularnim

membranama krvnih žila koje su povezane s tumorom. Povišene razine endostatina su povišene u osoba s metastazama.

Bachelot i sur. su 2006 ispitali prisutnost autoantitijela na endostatin u karcinomu dojke i zdravih ispitanica. Serumska antitijela na endostatin u zdravih ispitanica iznose 16%, u karcinomu dojke 66% , te 42.4% u pacijenata s metastazama. Autoantitijela na endostatin su veća u osoba s lokaliziranom bolešću te su povezana s boljom prognozom pacijenata koji imaju metastaze. Smatra se da autoantitijela na endostatin imaju ulogu u smanjenju progresije bolesti (Piura i Piura, 2010).

6.11 AUTOANTITIJELA NA LIPOFILIN B

Lipofilini i mamaglobini su dio uteroglobinske obitelji koji su prisutni u tkivu dojke. Također su prisutni i u drugim tkivima. Lipofilin B tvori kompleks s mamaglobinom te se otpušta u serum osoba.

Carter i sur. su pokazali da autoantitijela na lipofilin B nisu prisutna u 20 zdravih ispitanika, niti 30 osoba sa karcinomom pluća, ali su prisutna u 27% (20/74) ispitanica s karcinomom dojke . Ova autoantitijela također su utvrđena u 37,1% bolesnica u uznapređovalom stadiju bolesti. Autori sugeriraju da će autoantitijela na lipofilin B imati veliku ulogu u dijagnosticiranju karcinoma dojke u budućnosti (Piura i Piura, 2010).

6.12 AUTOANTITIJELA NA CIKLINSKE PROTEINE

Ciklini su molekule koje kontroliraju progresiju staničnog ciklusa iz G2 u M fazu i izraženi su u tumorima. Suzuki i sur. su ispitali prisutnost autoantitijela na ciklin u 120 pacijenata s karcinomima te su utvrdili najveću prisutnost autoantitijela na ciklin u osoba s karcinomom dojke (42,8%).

Leu i sur. su utvrdili postojanje autoantitijela na ciklin u 7.5% osoba s karcinomom dojke te u 5% kontrolne skupine. Prema dosadašnjim istraživanjima autoantitijela na ciklin nemaju dijagnostičku vrijednost kada se ispituju sama. Moguće je da će imati dijagnostički potencijal ako se ispituju zajedno s drugim molekulama (Piura i Piura, 2010).

6.13 AUTOANTITIJELA NA FIBULINSKI PROTEIN

Fibulin 1 (Fbln-1) je član novonastajuće obitelji glikoproteina koji se nalaze u ekstracelularnom matriksu i inhibiraju adheziju i motilitet *in vitro*. Postojanje autoantitijela na fibulin je prisutno u 75% osoba s karcinomom dojke i 25% zdravih kontrola. Fbln-1 potiče stanični i humoralni odgovor u osoba s karcinomom dojke. Saznanja da je ekspresija Fbln-1 povezana s poboljšanim preživljenjem u pacijenata s limfocitnim infiltratom, sugerira moguću uključenost Fbln-1 u imunološkom odgovoru osoba s karcinomom dojke. Autoantitijela na fibulin 1 mogu poslužiti kao dobar marker za ranu detekciju karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

6.14 AUTOANTITIJELA NA PROTEINE KOJI VEŽU INZULINU SLIČNE FAKTORE RASTA (INSULIN- LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 2, IGFBP-2)

Inzulinu slični faktori rasta (IGF1 i IGF2), IGF receptori 1i 2, IGFBP-1-6 čine komplekse. Taj kompleks se sastoji od peptidnih hormona, staničnih receptora i cirkulirajućih faktora. Oni su uključeni u regulaciju rasta, preživljenje i diferencijaciju tkiva. IGFBP su sekretorni proteini i posjeduju 80% homolognih sekvenci. IGFBP sudjeluju u slijedećim procesima: 1. imaju ulogu transportnih nosača za IGF, 2. stabiliziraju i produžuju poluvrijeme raspada IGF, 3. osiguravaju tkivno i stanično specifičnu lokalizaciju, 4. izravno stimuliraju ili inhibiraju IGF s njihovim receptorima (Piura i Piura, 2010).

Lu i sur. su putem ELISA testa dokazali prisutnost autoantitijela na IGFBP-2 u 15% osoba s karcinomom dojke i u 2% zdravih kontrola.

Goodell i sur. su utvrdili postojanje autoantitijela na IGFBP-2 u 5% pacijenata s karcinomom dojke i 40% osoba s kolorektalnim karcinomom i u 1% zdravih kontrola. Autori su zaključili da autoantitijela na IGFBP-2 razlikuju pacijente s karcinomom od kontrola ali čini se da ipak imaju malu vrijednost u ranoj dijagnostici i probiru karcinoma dojke (Piura i Piura, 2010).

6.15 AUTOANTITIJELA NA TOPO2 α PROTEIN

Topoizomeraza II je ubikvitarni enzim koji regulira DNA i ispravlja pogreške u genomu. Postoji u dva oblika: topoizomeraza 2 α i topoizomeraza 2 β . Topoizomeraza 2 α je esencijalni enzim i njegova razina dramatično raste tijekom proliferacije stanica. Usko je povezana sa mitotičkim kromosomima i ima esencijalnu ulogu u DNA replikaciji i mitozu (Piura i Piura, 2010).

Lu i sur. su uz pomoć ELISA testa otkrili prisutnost autoantitijela u 7% osoba s karcinomom dojke i u 2% zdravih kontrola.

6.16 AUTOANTITIJELA NA KATEPSIN D

Katapsin D je enzim koji ima ulogu u degradaciji proteina. Promjena ove funkcije rezultira akumulacijom lipofuscina u stanicama. Karcinomske stanice proizvode prokatepsin D i on ima funkciju mitogena karcinomskih i stromalnih stanica, te stimulira njihovu proinvazivnu i prometastatsku funkciju.

Lu i sur. su detektirali prisutnost autoantitijela na katepsin D u 5% osoba s karcinomom dojke i u 3% zdravih pojedinaca. Čini se da autoantitijela na katepsin D nemaju dijagnostički potencijal u karcinomu dojke (Piura i Piura, 2010).

7. KARCINOM PROSTATE

7.1 UVOD

Karcinom prostate je najčešće dijagnosticiran karcinom u muškaraca te drugi uzrok smrti uzrokovane karcinomom u Sjedinjenim Američkim Državama. Rana dijagnoza i terapija mogu povećati mogućnost liječenja bolesti, naročito onih tumora koji su lokalizirani, izbjegavajući tako progresiju i razvoj mikrometastaza. Trenutačno je prostata-specifični antigen (PSA, od engl. prostate- specific antigen) široko zastupljen u detekciji karcinoma prostate. Zahvaljujući PSA probiru, incidencija bolesti se povećala, a smrtnost smanjila. Većina muškaraca nema simptoma bolesti kada se otkrije tumor. Međutim, vrijednosti PSA su još uvijek tema mnogih rasprava. Otkad je u kliničkoj uporabi, rana detekcija karcinoma je porasla na 16%, dok smrtnost iznosi 3,4%. Problem PSA skrininga je manjak specifičnosti za karcinom prostate, naročito kad su PSA vrijednosti između 4 i 10 ng/ml. Specifičnost PSA skrininga za detektiranje karcinoma je 20%, a osjetljivost 80%. Slaba specifičnost se povezuje s činjenicom da su povišene razine PSA prisutne u stanjima koja nisu nužno karcinom kao što su benigna hiperplazija prostate i prostatitis. U strahu od karcinoma, povišene vrijednosti PSA su rezultirale biopsijama prostate. Prihvaćena je vrijednost PSA 4.0 ng/mL kao gornja normalna vrijednost PSA. Budući da PSA ima malu specifičnost, potrebno je istražiti biomarkere s boljom specifičnošću kako bi se izbjegle nepotrebne biopsije prostate. Nerealno je očekivati da će se otkriti biomarker koji će imati idealnu specifičnost i osjetljivost, ali bi trebali težiti tome da se otkriju biomarkeri koje karakterizira visoka specifičnost i osjetljivost. Istraživanje novih biomarkera zahtjeva analizu koja je visoko osjetljiva i specifična. Mnogo biomarkera je prisutno u malim količinama te nisu mjerljivi u serumu. Jedan od način

detektiranja biomarkera za karcinom prostate je analiziranje imunološkog odgovora bolesnika. Detektiranje autoantitijela je dio takovog pristupa (Wang,2008).

7.2 PSA AUTOANTITIJELA

PSA je serinska proteaza koju proizvodi epitel prostate. Od 1986, PSA je prihvaćen od strane FDA (Američka agencija za hranu i lijekove, engl. Food and Drug Administration) i jedini je biomarker kojeg preporučuje Američka udruga za rak. Titar anti-PSA autoantitijela je bio veći u osoba s hiperplazijom prostate; BHP (od engl. benign hiperplasia of prostate) nego u prostatitisu i kontrolnim skupinama. U studiji koja je obuhvaćala 200 pacijenata sa različitim stadijem karcinoma prostate i kontrolama, potvrđeno je postojanje anti-PSA autoantitijela u 11% seruma bolesnika s karcinomom prostate i 1.5% u kontrolnoj skupini. Navedeno upućuje na ulogu imunološkog odgovora u bolesnika s tumorima prostate. Razina anti-PSA autoantitijela je bila veća u osoba s androgen neovisnim karcinomom, ukazujući da povišena koncentracija autoantitijela na PSA može biti povećana u uznapredovalim stadijima karcinoma prostate (Wang,2008).

U istraživanju autoantitijela Lokanta i sur. 3.4% osoba je imalo autoantitijela na PSA (Wang,2008).

7.3 AUTOANTITIJELA NA HER2/NEU

U karcinomu prostate, HER2/neu je izražen u 25%-40% lokaliziranih tumora te u 60%-80% slučajeva metastaza. Imunoanaliza HER2/neu pokazuje razlike u osoba sa i bez metastaza. Povećana razina autoantitijela na HER2/ neu je prisutna u osoba s metastazama i povezana je s lošijom prognozom bolesnika. Autoantitijela na HER2/neu su bila povišena u svih pacijenata s karcinomom prostate (15%) i

kontrolnim skupinama(2%). Autoantitijela na HER2/neu su bila povišena u androgen-neovisnim karcinomima prostate (Wang,2008).

7.4 AUTOANTITIJELA NA HUNTINGTIN-INTERACTING PROTEIN 1 (HIP1)

Huntingtin-interactin protein (HIP1) je opisan kao protein koji reagira sa huntingtinom, bjelančevinom koja je produkt gena mutiranog u Huntingtonovoj bolesti. To je klathrin vežući protein uključen u transport receptora za čimbenike rasta. HIP1 transformira fibroblaste i produžuje poluvrijeme raspada receptora za čimbenike rasta. HIP1 je jako izražen u karcinomu prostate i povezan s progresijom karcinoma i metastazama. Upotrebljavajući mišji model karcinoma prostate, Bradley i sur. su otkrili da HIP1 ima važnu ulogu u nastanku tumora kod miševa. Test je imao specifičnost od 97%. Ovo istraživanje upućuje da HIP1 ima važnu ulogu u tumorigenezi te da seropozitivnost HIP1 možda ima bitnu ulogu u otkrivanju karcinoma prostate (Wang,2008).

7.5 AUTOANTITIJELA NA GLUKOZOM REGULIRANI PROTEIN-78 (GRP78)

Glukozom regulirani proteini su lokalizirani u endoplazmatskom retikulumu. To je obitelj proteina povezana sa staničnim stresnim bjelančevinama. Najbolje istražen GRP je GRP78. GRP78 je molekularni „čuvar“ (chaperon) koji stabilizira proteine u endoplazmatskom retikulumu. GRP78 ima antiapoptotička svojstva koja se povezuju s rezistencijom tumora na citotoksičnu terapiju. Od 1977, kada je otkriven, zabilježena je njegova prisutnost u brojnim tumorima kao što su tumor dojke, hepatocelularni tumor i tumor prostate. GRP78 je jako izražen u osoba koje imaju metastaze u kostima. Njegova ekspresija je značajno povezana s preživljenjem i povratom bolesti. Mintz i sur. su mjerili reakciju imunološkog sustava na GRP 78 u 108 pacijenata s karcinomom. Veća razina autoantitijela je bila prisutna u karcinomima dojke, ovarija i karcinoma pluća nemalih stanica koji su imali metastaze.

Ovaj podatak ukazuje da imunoreaktivnost usmjerena na GRP78 ima značajnu ulogu kao biomarker u otkrivanju karcinoma prostate. GRP78 nije samo povezan samo s prognostičkim indikatorima već predstavlja i moguću „metu“ terapije.

7.6 AUTOANTITIJELA NA ALPHA-METHYLACYL CoA RACEMASE (AMACR)

Otkriće autoantitijela na α -metilacil CoA racemazu (AMACR) je dalo nadu da će citoplazmatski markeri u budućnosti moći biti markeri skrininga. AMACR je enzim uključen u pretvorbu R-stereoizomerase zasićenih masnih kiselina u S stereoizomerazu. To je protein koji je visoko osjetljiv i specifičan u karcinomu prostate. Monoklonska antitijela na AMACR se danas upotrebljavaju u mnogim ustanovama za dijagnozu karcinoma prostate. Studije koje su ispitivale 807 ispitanika s karcinomom prostate, su potvrdile osjetljivost i specifičnost od 97% i 92% za detekciju karcinoma. Iako je AMACR jako koristan za detekciju tumora kada se nađe u tkivima, bilo bi bolje da ga se detektira u serumu. Humoralni odgovor na AMACR bio je predmetom mnogih istraživanja. Mjereći razinu autoantitijela na AMACR, Sreekumar i suradnici su mogli razlikovati osobe koje imaju karcinom prostate od kontrola. Imunoreaktivnost je bila viša u osoba koje su imale karcinom prostate, nego one koje su bile kontrolne skupine. Kada je nalaz PSA između 4 i 10 ng/mL, imunološki odgovor na AMACR je osjetljiviji nego PSA u razlikovanju osoba koje su oboljele od tumora i kontrolnih skupina (osjetljivost 77.8%, specifičnost 80.6%). U budućnosti, humoralni odgovor na AMACR ima potencijal nadopuniti detekciju karcinoma prostate. AMACR je povišen u epitelu karcinomskih stanica prostate. U istraživanju Sreekumar i sur. su pokazali uz pomoću ELISA testa da su 18 od 23 osoba s karcinomom kolona imala pozitivna autoantitijela na AMACR, za razliku od kontrola gdje su samo tri osobe bile imunološki pozitivne (Sreekumar i sur. 2004, Wang 2008).

7.7 AUTOANTIJELE NA PROTEIN KINAZU A (ECPKA)

U normalnim stanicama prostate protein kinaza (PKA) je smještena unutarstanično. Maligne stanice izlučuju PKA u medij u kojem rastu. Ta izvanstanična PKA se označava kao ECPKA (engl. extracellular PKA). ECPKA se nalazi u serumu osoba s karcinomom i kirurško odstranjenje tumora dovodi do smanjenja razine ECPKA u pacijenata. Autoantitijela na ECPKA su analizirana u 295 osoba s raznim karcinomima, 155 normalnih kontrola i 55 pacijenata bez karcinoma. Pokazana je prisutnost velike količine ECPKA u pacijenata s karcinomima. U podskupini pacijenata s karcinomom prostate (N=35) je nađen visok titar anti ECPKA (učestalost 86%, srednja vrijednost titra 2.95), dok je u kontrolnoj grupi titar bilo nizak ili negativan (učestalost 12%, srednja vrijednost titra 1.0) To ukazuje na vrijednost ECPKA kao biomarkera za karcinom prostate (Wang, 2008).

7.8 AUTOANTIJELE NA PROSTASOME

Prostasomi su male sekretorne granule koje sintetiziraju normalne ili neoplastične prostatične stanice čovjeka i oslobađaju se sa sadržajem prostate u duktuse žljezde. Stanice prostate i ekskretorni duktusi tvore zatvoren sistem. Visoko diferenciran karcinom prostate te veći tumori proizvode veću količinu prostatoma. Antigeni prostate su skriveni i ne pojavljuju se do puberteta. Kad prođu imunološku barijeru, imunološki sustav ih klasificira kao strane antigene i stvara protutijela. Autoantitijela na prostasome su potvrđena u 13 pacijenata čiji je PSA bio >50 i 39 pacijenata koji su bili zdravi i s niskim količinama PSA. Još jedna analiza uključuje prisutnost autoantitijela na prostasome u 88% osoba s karcinomom prostate. Ovaj titar autoantitijela ne korelira s vrijednostima PSA u serumu pacijenata. Antiprostasomski titar autoantitijela nije povezan s metastazama. Ovo se može objasniti činjenicom da

visoko diferencirani karcinomi prostate proizvode više prostasoma a samim time i više autoantitijela (Wang, 2008).

7.9 AUTOANTITIJELA NA MULTIPLE BIOMARKERE

Postoji mnogo TAA kao što su c-myc, cyclin B1, IMP1, Koc, p53, p62 i survivin. Serum osoba s karcinomom sadrži antitijela koji reagiraju s jedinstvenom grupom TAA, ali sa malom frekvencijom i niskom pozitivnom reakcijom na antigene. Ispitujući autoantitijela na 7 TAA(c-myc, cyclin B1, IMP1, Koc, p53, p62 i survivin, u 527 osoba sa karcinomom i 346 kontrola utvrđeno je postojanje autoantitijela od 44-68% (Wang, 2008).

7.10 AUTOANTITIJELA NA EPITELNI FAKTOR RASTA P75 (LEDGF P75)

LEDGF p75 je autoantigen koji se nalazi u osoba koje boluju od tumora ili atopičnih bolesti. Anti-LEDGF/p75 autoantitijela pokazuju citotoksičnu aktivnost. LEDGF p75 štiti stanicu od apoptoze inducirane stresom kroz aktivaciju gena povezanih sa stresom. Daniels i sur. su detektirali autoantitijela na LEDGFu 18.4% osoba s karcinomom prostate te u 5.5% osoba koje su bile kontrole. Autoantitijela na LEDGF p75 nisu detektirana u osoba s benignom hiperplazijom prostate. Ekspresija LEDGF p75 je bila prisutna u 93% ispitanika s tumorom prostate ali nije bila prisutna u zdravim kontrolama (Daniels i sur. 2005).

8. KARCINOM KOLONA

8.1 UVOD

Karcinom kolona je treći najčešći karcinom u svijetu kod muškaraca i drugi u žena. On uzrokuje 500 000 smrti godišnje. Zbog spore progresije, detekcija kolorektalnog karcinoma u ranim stadijima je važna za terapiju. Bitno je reći da su simptomi

karcinoma kolona nespecifični i mnogo pacijenata koji imaju karcinom kolona u ranom stadiju su asimptomatični. Stadij bolesti je najvažniji prognostički faktor. Petodišnje preživljenje karcinoma kolona u ranom stadiju (DUKES A i DUKES B) je 97%. Nažalost, inicijalna dijagnoza 60% kolorektalnog karcinoma je DUKES C i DUKES D s petogodišnjim preživljenjem od 5%. Tumorski markeri su bitni za detekciju i praćenje bolesti. Iako su biomarkeri dostupni u probiru karcinoma kolona, samo mali dio se koristi u kliničkoj uporabi. Testovi koji se upotrebljavaju za detekciju karcinoma kolona su CEA (karcinoembrijski antigen), testovi koji detektiraju familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP, od engl. familiar adenomatous polyposis), testovi koji detektiraju nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC, od engl. nonpolyposis colorectal cancer) i testovi za okutno krvarenje u stolici (FOBT, od engl. fecal occult blood test). Drugi potencijalni kolorektalni tumorski markeri su CA 242, CA 19-9, CA 50, tkivni aktivator plazminogena, tkivni polipeptidni specifični antigen te tkivni inhibitor metaloproteinaze 1. Nijedan od tih markera nema dovoljnu specifičnost i osjetljivost u detektiranju stupnja kolorektalnog karcinoma. Unatoč niskoj osjetljivosti za kolorektalni karcinom, CEA se još uvijek koristi za dijagnostiku i praćenje pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Potrebno je razviti dovoljno specifične i osjetljive markere koji mogu zamijeniti CAE u detekciji kolorektalnog karcinoma. Identifikacija autoantitijela koja će detektirati kolorektalni karcinom je još uvijek u fazi istraživanja. Imunološki odgovor na kolorektalni tumor je raznolik. U pacijenata s kolorektalnim karcinom je povećana razina autoantitijela na p53, p62, CEA, HER-2/neu, Ras, topoizomerazu II α , histon deacetilazu 3 i 5, ubikvitin C-terminalnu hidrolazu L3, tirozinazu, tropomiozin i ciklin B.

U istraživanju kojeg su proveli Chang-Chuang i sur. uključivalo je 94 pacijenata s kolorektalnim karcinomom i 54 normalnih kontrola, pokazala se prisutnost

autoantitijela. Seropozitivnost je varirala od 18.1% do 35.1% Seropozitivnost na svaki od 5 antigena je bila 58.5% a seroreaktivnost na CEA je bila 77.6%. Seropozitivnost na kolorektalni karcinom u ranom stadiju na CEA je bila 21.9% te seropozitivnost na druge antigene je bila 53.7% (Chang-Chuang i sur. 2010).

8.2 AUTOANTITIJELA NA MUC5AC

MUC5A je promijenjeni mucin koji je izražen u kolorektalnim polipima i karcinomu. Njegova razina je povišena u pacijenata s kolorektalnim karcinomom. Uz pomoć ELISA testa detektirana su autoantitijela na MUC5AC u 27.3% zdravih kontrola, 45% ispitanika s polipima na crijevima te u 60% osoba s kolorektalnim karcinomom. Prisutnost slobodno cirkulirajućih MUC5A autoantitijela je bila povišena u ispitanika s polipima. Autoantitijela na MUC5A su bila povezana s prisutnošću polipa crijeva. Seroreaktivnost na MUC5AC je veća u osoba koji imaju kolorektalni tumor. Autoantitijela su bila povišena u osoba sa lošim ishodom bolesti. Lošiji ishod bolesti u osoba s MUC5AC autoantitijelima je u skladu s ranijim istraživanjem ovih autora koje je pokazalo smanjenje MUC5AC ekspresije u osoba s boljim preživljenjem (Kocer i sur. 2006).

8.3 AUTOANTITIJELA PROTIV IAPA I XIAPA

U inhibitore apoptoze IAPs (prema engl.inhibitor of apoptosis proteins) spadaju survivin, livin i XIAP (prema engl. X-linked IAP). Oni su prisutni u visokoj koncentraciji u mnogo solidnih i hematoloških tumora. Survivin ima ulogu inhibiranja apoptoze i proliferacije stanice. Također ima ulogu izbjegavanja imunološkog sustava putem indukcije humane transverzne transkriptaze i Fas liganda. Livin i XIAP imaju ulogu u raznim vrstama karcinoma. Hosono i sur. su utvrdili nisku razinu autoantitijela na survivin 24.4% u osoba s kolorektalnim tumorom (Hosono et al, 2014).

8.4 AUTOANTITIJELA NA Ca^{2+} VEŽUĆI PROTEIN „CALNUC“

„Calnuc“, još zvan i „Nukleobindin“ je kalcijски vežući protein koji se nalazi u Golgijevom tijelu i citoplazmi i možda ima ulogu u G i Ca^{2+} - reguliranim transdukcijskim elementima. Ima ulogu u DNA vezivanju. Istraživanje Chen i sur. je potvrdilo prisutnost autoantitijela na „Calnuc“ u 11.5% osoba s karcinomom kolona (Chen i sur. 2007).

8.5 AUTOANTITIJELA NA RABHILIN 3A LIKE PROTEIN (RPH3AL)

RPH3AL je protein koji se sastoji od 302 aminokiseline. On se nalazi u endokrinim stanicama i uključen je u egzocitozu kroz interakcije sa citoskeletom. Mutacije RPH3AL, koje se nalaze na 17p13.3 lokusu su povezane s razvojem kolorektalnog karcinoma. U istraživanju Chen i sur. frekvencija RPH3AL je 64.7%, 78.0%, 72.6%. Ove vrijednosti su veće nego frekvencija RPH3AL autoantitijela u zdravim kontrolama 15.9%. Iako prisutnost autoantitijela na RPH3AL ne korelira sa kliničkim parametrima, autoantitijela na RPH3AL su nađena u 69.4% osoba koje imaju kolorektalni karcinom a negativni su na karcinoembrijski antigen. Cirkulirajuća autoantitijela prevladavaju u pacijenata sa kolorektalnim karcinomom i detekcija ovih autoantitijela može pomoći u neinvazivnom pristupu (Chen i sur. 2011)

8.6 AUTONTITIJELA NA RAS PROTEINE

Ras onkogeni su geni povezani s karcinomom i njih aktiviraju brojne mutacije u karcinomima čovjeka. U obitelji ras gena spada H-ras-1, K-ras-2 i N-ras. Aktivacija ras onkogeni se događa na 12 ili 61 kodonu. Rezultat mutacija je supstitucija aminokiseline unutar p21 ras proteina. Mutirana ras bjelančevina gubi GTP-aznu aktivnost i nekontrolirano aktivira signalne puteve. Mutirani ras proteini se nalaze u malignim tumorima i 45% ih se nalazi u adenokarcinomu kolona. Mutirani p 21 ras protein se ne nalazi u normalnim tkivima već u karcinomskim stanicama. Takahaski i

sur. su ispitivali 160 osoba s karcinomom kolona i 60 kontrola da bi utvrdili prisutnost autoantitijela na p21 ras protein. Potvrđeno je postojanje autoantitijela u 32% osoba s karcinomom kolona, dok je u normalnih osoba bilo 2.5%. Velika incidencija IgA autoantitijela na p21-K- ras -D12 u osoba sa karcinomom kolona je povezana s postojanjem karcinoma (Takahaski i sur. 1995).

8.7 AUTOANTITIJELA NA p21

P21 je najprije opisan kao tumor-supresorski protein. Međutim, kasnija istraživanja su pokazala da može imati onkogeni svojstva ovisno o različitim čimbenicima kao što su vrijeme ekspresije, post-translacijske modifikacije i lokalizacija unutar stanice. Za razliku od nuklearnog p21, citoplazmatski p21 ima onkogeni funkciju i povezan je s agresivnim fenotipovima karcinoma. U istraživanju Bisheshari i sur. sudjelovalo je 25 ispitanika s karcinomom kolona i 13 kontrola. Njihovi serumski ispiti su pomoću ELISA testa u svrhu dokazivanja autoantitijela na p21. Potvrđeno je postojanje višeg titra autoantitijela na p21 u osoba koje imaju karcinom nego u onih koji su bile kontrole. Utvrđena je prisutnost višeg titra autoantitijela u osoba s uznapredovalim stadijem bolesti i zahvaćenošću limfnih čvorova (Bishehari i sur. 2014).

8.8 AUTOANTITIJELA USMJERENA NA VILIN

Vilin je protein koji se nalazi u mikrovilima epitelnih stanica tankog crijeva, kolona i pankretobilijarnog trakta. Ima važnu ulogu podupiranja aktinske jezgre mikrovila. U karcinomu kolona vilin se nalazi difuzno u citoplazmi i smješten je blizu membrane. Struktura vilina slična je humanom serumskom proteinu gelozinu. Zbog toga imunološki sustav ne odstranjuje brzo vilin. Vilin je prisutan u 50% osoba s kolorektalnim karcinomom. Rimm i sur. su istraživali prisutnost protutijela usmjerena na vilin u pacijenata sa karcinom kolona, kolitisom, Crohnovom bolešću, ulcerativnim kolitisom i kontrolnoj skupini. Potvrđena je prisutnost autoantitijela na vilin u 80%

osoba s karcinomom kolona, 61% osoba s kolitisom, 42% osoba s Crohnovom bolešću, 44% osoba s ulcerativnim kolitisom i 33% kontrola. Prisutnost autoantitijela viša je u osoba s karcinomom. To je zbog toga jer karcinomske stanice proizvode vilin u izmijenjenim uvjetima što rezultira promjenom u staničnoj lokalizaciji i mogućom sekrecijom vilina. Određivanje autoantitijela na vilin predstavlja značajan potencijal u detektiranju karcinoma kolona (Rimm i sur. 1995).

9. ZAKLJUČAK

Rana detekcija maligne bolesti i terapija u preinvazivnom stanju bolesti značajna je za sudbinu bolesnika. Biomarkeri potječu iz tumorskih stanica ili nastaju kao imunološka reakcija domaćina. Osim što mogu imati podrijetlo iz tumorskih stanica, oni su prisutni u nastanku tumora ali i njegovom daljnjem razvitku. Biomarkeri mogu biti proteini, hormoni ali i enzimi. Oni nam omogućuju: 1. probir zdravih ljudi ili ljudi s većim rizikom za obolijevanje od karcinoma; 2. dijagnosticiranje karcinoma ili posebnog tipa karcinoma; 3. prognozu bolesti za bolesnika; 4. praćenje tijeka ozdravljenja i uspjeha terapije nakon kirurškog zahvata, radioterapije ili kemoterapije. Velik problem biomarkera je nedovoljna osjetljivost i specifičnost te nijedan od njih nije zadovoljio uvjete idealnog biomarkera. Mnoga istraživanja usmjerena su na otkriće autoantitijela na tumorske antigene u serumu bolesnika s malignim bolestima. Patogeneza ovih autoantitijela je: imunosna reakcija domaćina na tumor-specifične antigene, razaranje tumorske stanice zbog kojeg dolazi do otpuštanja antigena, poremećaj regulacije imunološkog sustava domaćina. Glikozilacija, oksidacija i proteolitičko cjepanje su post-translacijske promjene kroz koje prolaze pojedini antigeni. Autoantitijela se pojavljuju prije kliničke manifestacije bolesti od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. Metode određivanja autoantitijela u krvi su neinvazivne, jeftine i jednostavne. Autoantitijela na tumorske markere su osjetljivije i specifičnije molekule u ranoj dijagnostici tumora od samih antigena. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile mogućnosti šire primjene autoantitijela u kliničkoj praksi.

10 . ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici, prof.dr.sc Maji Sirotković- Skerlev na nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima što su me poticali da usvajam nova znanja i iskustva te postanem bolji čovjek.

11.LITERATURA

1. Arun Sreekumar, Bharathi Laxman, Daniel R. Rhodes, Bhagavathula S, Harwood J, Giacherio D, Ghosh D, Sanda M.G, Rubin M.A, Chinnaiyan A.M (2004) Humoral Immune Response to α Methylacyl-CoA Racemase and Prostate. *Cancer Journal of the National Cancer Institute* 96:834-843.
2. Bishehari F, Gash J.S, Akagi N, Bauer J, Jung B.H (2014) Anti-p21 autoantibodies detected in colorectal cancer patients: A proof of concept study. *Oncol Immunology* 3(8):e952202.
3. Chan C. C, Fan C. W, Kuo Y. B, Chen Y. H, Chang P. Y, Chen K. T, Hung R.P, Chan E. C (2010) Multiple serological biomarkers for colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer* 126(7): 1683-1690.
4. Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Woolston C, Sahin U, Barnes A, Robertson J (2007) Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Annals of Oncology* (2007). 18:868-873
5. Chen J.S, Kuo Y.B, Chou Y.P, Chan C.C, Fan C.W, Chen K.T, Huang Y.S, Chan E.C (2011) Detection of autoantibodies against Rabphilin-3A-like protein as a potential biomarker in patient's sera of colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 412(15-16):1417-1422.
6. Chen Y, Lin P, Qiu S, Peng XX, Looi K, Farquhar M.G, Zhang J.Y (2007) Autoantibodies to Ca^{2+} binding protein Calnuc is a potential marker in colon cancer detection. *Int J Oncol* 30(5):1137-1144.
7. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot M.L, Yamada B, Heeb M.J, Sheets S.M, Wu X, Casiano C.A. (2005) Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to

LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 1:14-26.

8. Dedić-Plavetić N, Gamulin S, Kovač Z (2011) Zloćudna preobrazba i rast U: Gamulin S i sur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada, str: 669-709

9. Dudas S.P, Chatterjee M, Tainsky M. A (2010) Usage of cancer associated autoantibodies in the detection of disease. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers* 6(0):257-270.

10. <http://www.news-medical.net/health/What-is-a-Biomarker.aspx>

11. Fabian C. J, Kimler B. F (2007) Use of biomarkers for breast cancer risk assessment and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 106(1): 31-39.

12. Hosono Y., Goto M., Kobayashi D., Kuribayashi K., Tanaka M, Watanabe N. (2015) Diagnostic relevance of autoantibody detection against inhibitors of apoptosis proteins in colon cancer and colon adenoma. *Molecular and Clinical Oncology* 3(3):595-600.

13. Lacombe J, Mangé A, Solassol J (2014) Use of autoantibodies to detect the onset of breast cancer. *J Immunol Res* 2014:574981, (1-8)

14. Kocer B, McKolanis J, Soran A (2006) Humoral immune response to MUC5AC in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. *BMC Gastroenterology* 6:4

15. Mikeska T, Craig M.J (2014) DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes* 5(3): 821-864.

16. Nesterova M, Johnson N, Cheadle C , Cho-Chung Y. S (2006) Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1762(4): 398-403.
17. O'Rourke D.J, DiJohnson D.A, Caiazzo R.J Jr, Nelson J.C, Ure D, O'Leary M.P, Richie J.P, Liu B.C (2012) Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen. *Clin Chim Acta* 413(5-6):561-567
18. Piura E, Piura B. Autoantibodies to tumor-associated antigens in breast carcinoma. *J Oncol.* 2010;2010:264926. (1-14) (Epub 2010 Nov 21.)
19. Pedersen J.W, Gentry-MaharaA, Nøstdal A, Fourkala E.A, DawnayA, Burnell M, Zaikin A, Burchell Y, Papadimitriou Y.T, ClausenH, Jacobs I, Menon U, Wandall H.H (2013) Cancer-associated autoantibodies to MUC1 and MUC4—A blinded case–control study of colorectal cancer in UK. *International Journal of Cancer* 134:2180–2188.
20. Pedersen J.W, Blixt O, Bennett E.P, Tarp M.A, Dar I, Mandel U, Poulsen S.S, Pedersen A.E, Rasmussen S, Jess P, Clausen H, Wandall H.H (2011) Seromic profiling of colorectal cancer patients with novel glycopeptide microarray. *Int J Cancer* 128(8):1860-1871.
21. Ran Y1, Hu H, Zhou Z, Yu L, Sun L, Pan J, Liu J, Yang Z (2008) Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer. *Clin Cancer Res.* 14(9):2696-2700.

22. Rimm D.L, Holland T.E, Morrow J.S, Anderson J(1995) Autoantibodies Specific for Vilin found in Patients with Colon Cancer and other coloitides. *Digestive Diseases and Sciences* 40: 389-395

23. Schipper M, Wang G, Giles N, Ohrnberger J (2015) Novel Prostate Cancer Biomarkers Derived from Autoantibody Signatures *Translational Oncology* 8:106–111

- 24.Tainsky M. A (2009) Genomic and Proteomic Biomarkers for Cancer: A Multitude of Opportunities. *Biochimica et biophysica acta* 1796(2):176-193.

25. Takahashi M, Chen W, Byrd D.R, Disis M.L., Huseby E.S, Qin H, McCahill L, Nelson H, Shimada H, Okuno K, Yasutomi M, Peace D.J, Cheever M.A (1995) Antibody to ras proteins in patients with colon cancer. *Clinical Cancer Research* 1 (10):1071-1077.

26. Ullah M. F, Aatif M (2009) The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer treatment reviews* 35(3): 193-200.

27. Wang X (2008) Autoantibody biomarkers in prostate cancer. *Lab Medicine* 39(3): 165-171.

28. Zaenker P, Ziman M. R (2013) Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers—a review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 22(12): 2161-2181

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3.8.1989 godine u Novoj Gradišci. Od 1997 do 2004 pohađala sam Osnovnu školu Ljubljanka u Zagrebu. Nakon završetka osnovne škole, 2004. godine upisujem X. gimnaziju „Ivan Supek“ u Zagrebu. Srednju školu završavam 2008. godine te upisujem Medicinski fakultet u Rijeci. Dvije tisuće i devete godine se prebacujem na Medicinski fakultet u Zagrebu.